谷子 *PAL* 基因家族全基因组的鉴定和表达分析

孟亚轩，孙颖琦，赵心月，王凤霞，瓮巧云，刘颖慧*

（河北北方学院 农林科技学院，河北 张家口 075000）

摘　要：苯丙氨酸解氢酶（Phenylalanine ammonia-lyase，PAL）基因家族参与苯丙烷类代谢过程，通过调控植物抗病次生物质的合成在植物抗逆反应中发挥重要作用。为明确谷子 *PAL* 基因家族在逆境胁迫下的表达规律，该文利用生物信息学方法对谷子 *PAL* 基因家族进行鉴定和表达分析。结果表明：谷子具有 11 个 *PAL* 基因，在进化树中可分为 3 个亚家族，SiPAL7 独自进化为一支。通过构建蛋白结构域发现 *PAL* 基因家族成员均含有保守的 PAL 结构域。启动子分析显示，*PAL* 基因含有应答激素、逆境胁迫等多种因子的顺式作用元件，说明 *PAL* 基因广泛参与不同生物学调控过程。qRT-PCR 结果显示，谷子 *PAL* 家族基因多为诱导型表达，不同光照条件下 *PAL* 基因表达量变化明显，不同基因具有不同响应模式，说明谷子 *PAL* 基因家族在参与光调节反应中发挥重要作用。谷子 *PAL* 基因高度保守，广泛响应不同非生物胁迫，具有表达特异性。该研究结果可为揭示 *PAL* 基因家族在调节谷子抗性及胁迫应答过程中的作用提供参考。

关键词：谷子，*PAL* 基因家族，生物信息学分析，蛋白结构，表达分析

中图分类号：Q943

Genome-wide identification and expression of millet *PAL* gene family

MENG Yaxuan, SUN Yingqi, ZHAO Xinyue, WANG Fengxia, WENG Qiaoyun, LIU Yinghui*

（*College of Agriculture and Forestry*, *Hebei North University*, Heibei Zhangjiakou 075000, China）

Abstract: The Phenylalanine Ammonia-Lyase（PAL）is a key enzyme catalyzes the the first step phenylalanine to trans-cinnamic acid involve in the process of phenylpropane metabolism. *PAL* gene family plays an important role in the process of plant resistance through regulating the synthesis of plant antibiotics, and is usually encode by a multi-gene family. In order to clarify the expression and thea comprehensive analysis of the millet *PAL* gene family under adversity stress, uses bioinformatics methods to identify and analyze the *PAL* gene family in millet. The results showed that millet has 11 *PAL* genes, which are unevenly distributed in different chromosomes. All the *PAL* gene family contain conserved *PAL* domains with 1 to 6 exons. Phylogenetic analyses show the *PAL* gene can be divided into 3 subfamilies, except SiPAL7 evolved into one by itself. *PAL* gene contains cis-acting elements that respond to hormones, adversity stress and other factors, indicating that *PAL* gene is widely involved in different biological regulation processes. The expression patterns of *PAL* gene changes obviously under different light conditions, and different genes have different response patterns. The *PAL* gene of millet is highly conserved, responds to different abiotic stresses. The results suggesting that *PAL* genes may play important roles in the regulation of development and stress responses.

Keywords: millet, *PAL* gene family, bioinformatics analysis, protein structure, expression analysis

---

收稿日期：2020-12-29

基金项目：国家重点研发计划项目十三五国家粮食丰产增效科技创新专项（**No.2017YFD0300305**）；河北省科技厅项目（**No.19226420D**）[Supported by National Science and Technology Innovation Project of the 13th Five-Year Plan **(No.2017YFD0300305)**; Hebei Science and Technology Department Project **(No.19226420D)**]。

作者简介：孟亚轩（1997-），硕士研究生，研究方向为植物生理，(E-mail)997027363@qq.com。

通讯作者：刘颖慧，博士，教授，研究方向为分子生物学，(E-mail)leely519@126.com。

苯丙氨酸解氢酶（Phenylalanine Ammonia-Lyase，PAL）是苯丙烷代谢途径中的关键酶，参与木质素及酚类化合物的合成过程，广泛存在于各种植物中（Fraser& Chapple, 2011；盖江涛等，2016）。Koukol & Comm(1961)在大麦（*Hordeum vulgare*）中首次提取出 PAL 蛋白，后续马铃薯（*Solanum tuberosum*）（Joos & Hahl, 1992）、烟草（*Nicotiana tabacum*）（Reichert et al., 2009）等高等植物也相继分离纯化得到 PAL 蛋白。杨郁文等（2017）研究发现 PAL 多以同源四聚体形式存在于细胞质和叶绿体内，通过转录水平等多层次调控方式，在植物防御系统中发挥重要作用。启动子缺失实验表明，MYB 转录因子可通过结合 *PAL* 启动子区段，进行转录水平调控（杨郁文等，2017）。*PAL* 可通过调控 HCA 类酚类、类黄酮等产物的合成影响果实品质（张丽之等，2018）。除此之外，*PAL* 广泛参与植物响应病原菌侵染过程。杨会晓等(2019)研究表明 *PAL* 与香蕉抗病性密切相关，在枯萎病菌侵染过程中 *PAL* 高丰度表达。*PAL* 活性的增加与苯丙烷类产物的产量提高密切相关，其活性水平随发育阶段、细胞和组织的分化、不同应激刺激而改变。Lister et al.（1996）首次发现 *PAL* 活性与苹果(*Malus pumila*)果实类黄酮含量存在显著正相关。杨会晓等（2019）发现 *MaPAL* 在香蕉（*Musa nana*）果实发育成熟过程高丰度表达，同时次级代谢物质在这一阶段也具有较高的表达效率。Olsen et al.(2008)研究发现拟南芥（*Arabidopsis thaliana*）*AtPAL1* 和 *AtPAL2* 基因在氮胁迫和温度变化过程中高丰度表达，并伴随着类黄酮化合物的积累。

随着基因组学的发展，多种植物基因组测序相继完成，植物中 *PAL* 基因的功能也陆续得到研究。大豆（*Glycine max*）*PAL1-1*、*PAL2-1*、*PAL2-3* 在木质素合成过程中发挥重要作用（候鹏等，2016）；*ZmPAL10* 强烈响应纹枯病菌侵染玉米（*Zea mays*）过程（邓路长等，2019）；*VamPAL* 参与山葡萄（*Vitis amurensis*）花色苷的积累（陈蒙等，2018）。基因组学的迅速发展标志着在分子水平上进行系统分析已成为当下生物学研究的主流趋势（王灿等，2020）。谷子（*Setaria italica*）属 1 年生禾本科作物，基因组小且为二倍体，具有抗旱性强、生育期短、产量高等特点，是挖掘作物抗旱基因和解读抗逆分子机制的重要作物（宋健等，2020）。谷子生育期内需水量较少，属环境友好型作物（宋健等，2019），抗逆育种靶向基因资源的研究已成为谷子增收工作的重要环节（Nadeem et al., 2020）。谷子基因组测序的完成为谷子研究搭建了数据基础，标志着谷子遗传研究已进入后基因组学时代（Bennetzen et al., 2012；Zhang et al., 2012）。*PAL* 基因家族广泛存在于植物中，但关于谷子 *PAL* 基因家族的研究却鲜有报道。为明确谷子 *PAL* 基因家族在逆境胁迫过程中的作用机理，本研究利用生物信息学方法对谷子 *PAL* 基因家族进行鉴定，分析其结构特点及进化方式，并构建 *PAL* 家族基因在非生物胁迫下的表达模式，为谷子 *PAL* 基因家族的生物学功能研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试谷子（*Setaria italica*）品种为 1 年生‘张杂谷 8 号’，盆栽种植于河北北方学院农场，分别置与自然光、黑暗、红光、蓝光、远红光条件下照射 24 h，取幼嫩叶片，液氮速冻后，-80 ℃保存备用。

1.2 谷子 *PAL* 基因的鉴定及蛋白序列分析

利用 Pfam 数据库查找并下载 PAL 蛋白结构域的隐马模型文件（Pfam 号码：00221）（Finn at al., 2008），利用 plant Genes 基因组获取 Gene stable ID 及 Transcript stable ID，通过 CDD 和 InterProScan 对 Gramene 网站获取的序列进行筛选鉴定，去除冗余，得到 PAL 蛋白序列、染色体定位等基因信息（Marchler et al., 2009; Hunter et al., 2009）。利用 ProtParam 数据库通过序列信息得到氨基酸数量、等电点等用于推测蛋白质的相关因子（宋健等，2020）。

1.3 基因的染色体定位

通过 MG2C 在线工具，利用谷子 *PAL* 基因位置信息以及从 Ensemble Plants 查询到的谷子染色体长度，绘制 *PAL* 基因的染色体定位。

1.4 谷子 PAL 蛋白分析及进化树绘制

使用 ProSite 和 Clustal X 在线软件对谷子 PAL 蛋白结构域位置进行序列对齐。通过 MEGA6.0 软件中的衔接法（neighbor-joining, NJ）采样泊松模型绘制蛋白进化树（bootstrap 为 1 000）（Sigrist et al., 2010; Larkin

et al., 2007）。通过上述方法对二穗短柄草（*Brachypodium distachyon*）、高粱（*Sorghum bicolor*）、狗尾草（*Setaria viridis*）等 54 个 PAL 家族成员绘制蛋白进化树（bootstrap 为默认值）。

1.5 Motif 获取及蛋白预测

在 MEME 网站得到谷子 PAL 的 motif 模式（最小宽度设置为 60，最大宽度设置为 200）（Bailey et al., 2009），利用 Weblogo 分析得出 PAL 结构域 motif（Stacks per Line 设置为 100），最后在 SWISS-MODEL 网站中利用其各基因位点出现频率最高基因组成的保守序列预测其三维结构并得到螺旋模式（Kiefer et al., 2009），并根据上述方法对二穗短柄草、水稻等物种的 PAL 蛋白进行预测，分析对比各物种的蛋白结构差异。

1.6 *PAL* 同源共线性分析

在 PAL 系统发育的基础上，谷子和水稻（*Oryza sativa* ）的直系同源片段已得到鉴定。利用 Ensembl Plants 网站的基因组比较功能得到谷子和水稻 *PAL* 同源物的同源共线图（Wang et al., 2012）。通过其染色体定位及基因位置，在 Adobe Illustrator CS4 软件绘制谷子和水稻 *PAL* 同源物的同源共线图，分析其共线性。

1.7 *PAL* 基因结构分析

通过 Phytozome 数据库获得谷子 *PAL* 基因的序列信息，使用 GSDS2.0 在线数据库分析其编码序列，得到内含子-外显子结构模型（Hu et al., 2015）。在谷子基因组数据库得到 *PAL* 起始密码子上游 1 500 bp 区域序列，利用 plantCARE 分析其顺式作用元件，通过 GSDS2.0 将其可视化（Lescot et al., 2002）。

1.8 谷子 *PAL* 基因表达模式分析

在 Phytozome 数据库获得 11 个基因在不同诱导处理下的表达模式，包括了强光诱导两周的叶片、强光诱导一周的芽、黑暗诱导的地上组织、红光诱导的地上组织、正常光诱导的根、干旱诱导的根、尿素诱导的根、强光诱导的穗，利用 TBtools 绘制热图（Chen et al., 2020）。

1.9 谷子 *PAL* 基因在不同光质照射下的 RT-qPCR 分析

利用 DNAMAN 设计引物，选择 *Actin* 为内参基因。使用植物总 RNA 试剂盒提取 RNA（天根生化科技有限公司），FastQuant RT Kit 合成 cDNA，使用 Agilent 3000P 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增。反应条件为 95 ℃预变性 2 min，95 ℃变性 15 s，60 ℃退火 30 s，40 个扩增循环，每个样品进行 3 次重复，采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 进行数据处理。

2 结果和分析

2.1 谷子 *PAL* 基因家族鉴定

利用 CDD 和 InterProScan 软件对 plant Genes 63 基因组获取的 Gene stable ID 及 Transcript stable ID（PF 号码为 00221）检测鉴定，并检查缺失，去除冗余，获得谷子 *PAL* 基因序列。谷子中共鉴定 11 个 *PAL* 家族基因，分别命名为 *SiPAL1~SiPAL11*（表 1）。11 个 PAL 蛋白序列差异较小：氨基酸长度为 698 aa（SiPAL1、SiPAL8）~891 aa（SiPAL7），开放阅读框长度 2 142 bp（*SiPAL3*）~4 610 bp（*SiPAL2*），分子质量为 74.99 kD（SiPAL8）~95.01 kD（SiPAL7），等电点为 5.82（*SiPAL5*）~6.52（*SiPAL6*），含有 1（*SiPAL3*、*SiPAL4*、*SiPAL5*）~6（*SiPAL7*）个外显子。通过表 1 发现位于 1 号染色体的 5 个基因（*SiPAL1-SiPAL5*）具有相似的编码蛋白特征，且基因位置紧密排列在一起，位于 7 号染色体的 3 个基因（*SiPAL9-SiPAL11*）虽然紧密排列，但其编码蛋白的特征却相差较大。所有 PAL 蛋白的等电点均在 5.82~6.52 之间，说明苯丙氨酸解氢酶具有酸性特征，PAL 蛋白可能在弱酸性的环境中发挥作用。*PAL* 家族基因除 *SiPAL7*（6）外，外显子数量较小，推测 10 个 *PAL* 家族基因具有相似的功能。

由 *PAL* 基因的染色体分布来看，1 号染色体有 5 个紧密排列的 *PAL* 基因，分布的基因数量最多；7 号染色体具有 3 个 *PAL* 基因且紧密排列，其他染色体上没有成簇 *PAL* 基因分布（表 1，图 1）。还发现 *PAL* 基因不均匀分布在染色体各个部位，其中 1 号染色体和 7 号染色体 *PAL* 基因形成簇状分布。利用 Phytozome 数据库的 Gbrowse 功能比对成簇分布的 *PAL* 基因家族成员与侧翼编码蛋白质基因位置关系，并参考 Holub（2001）对基因簇的界定，暗示谷子 *PAL* 家族基因可通过串联复制实现家族扩增。

表 1 谷子 *PAL* 基因家族信息

Table 1 *PAL*-domain gene family information of millet

基因名 Gene name	转录名 Genomic accession no.	位置 Location（bp）	染色体位置 Chromosome location	外显子数量 No.of extron	开放阅读框长度 Open reading fragment length（bp）	推测蛋白质 Speculated proten		
						氨基酸（aa） Amino acid	分子质量 Molecular mass（kD）	等电点 Isoelevtric point
SiPAL1	KQL30567	31757351~31761757	I	2	4 407	698	75.16	5.86
SiPAL2	KQL30568	31766821~31771430	I	2	4 610	718	77.8	5.94
SiPAL3	KQL30569	31785798~31787939	I	1	2 142	713	76.76	5.89
SiPAL4	KQL30570	31795010~31797372	I	1	2 363	713	76.78	5.89
SiPAL5	KQL30571	31806380~31808854	I	1	2 475	714	76.84	5.82
SiPAL6	KQL27213	48576433~48579669	II	2	3 237	703	75.7	6.52
SiPAL7	KQL13034	2230732~2234478	III	6	3 747	891	95.01	5.97
SiPAL8	KQL02164	30509268~30512764	VI	2	3 497	698	74.99	5.93
SiPAL9	KQK98112	25018087~25020976	VII	2	2 890	703	75.58	6.18
SiPAL10	KQK98115	25037649~25040471	VII	2	2 823	701	75.52	6.07
SiPAL11	KQK98116	25050638~25053780	VII	2	3 143	850	91.2	6.39

图 1 谷子 *PAL* 基因家族的染色体分布

Fig.1 Chromosome distribution of *PAL* gene family in millet

2.2 谷子 PAL 蛋白进化树的构建

利用蛋白序列对齐文件，通过衔接法绘制出谷子 PAL 的进化树（图 2）。根据进化树拓扑结构可以分为 3 组蛋白，发现第 1 组和第 2 组蛋白数量相同且分支分布情况相似，还发现小部分 PAL 蛋白的临界值达到 100。根据进化树的拓扑情况，说明这两组基因可能经过复制的方式得到或者执行相似基因功能。由进化树聚类分析得出相同 PAL 蛋白结构域与同一基因扩增或复制的蛋白聚合在一起，如 SiPAL6 和 SiPAL9 分散复制聚在一起，相同结构域聚合为一组。另外 SiPAL7 独自分支为一组，说明 SiPAL7 可能具有不同的进化轨迹。

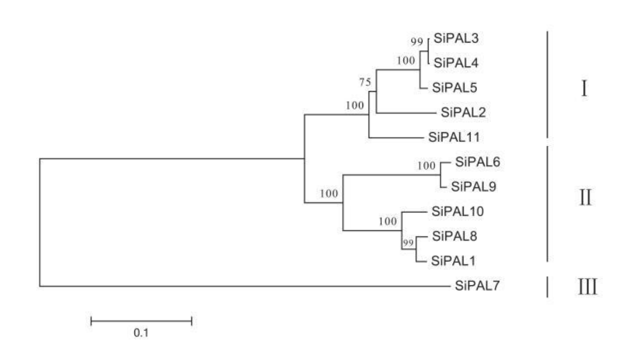
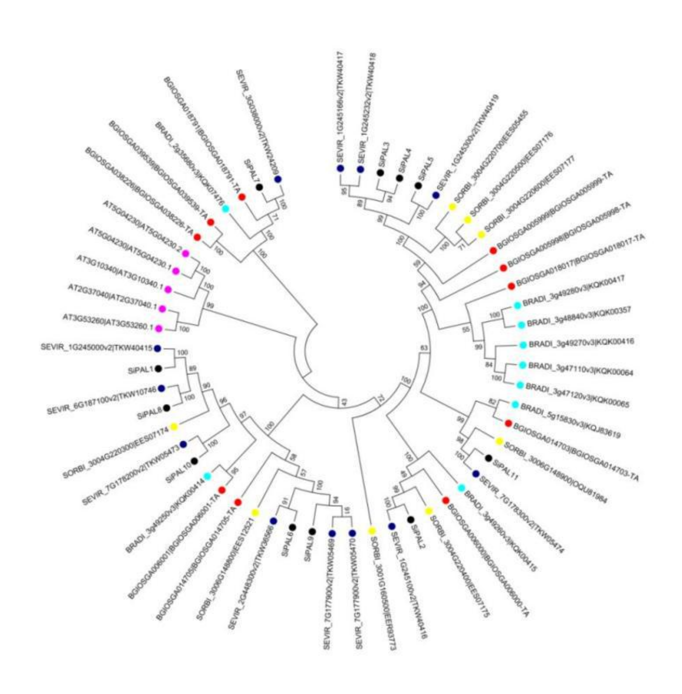


图 2 PAL 系统发育进化树

Fig.2 Phylogenetic tree of PAL-protein

2.3 不同物种 PAL 蛋白进化关系

为揭示谷子 *PAL* 基因家族演化关系，利用 MEGA6.0 软件将单、双子叶共 6 个物种的 54 个 PAL 蛋白利用衔接法构建系统发育进化树（图 3）。*PAL* 基因家族演化分析中选用二穗短柄草 9 个，高粱 8 个、狗尾草 11 个、水稻 10 个、拟南芥 5 个 PAL 蛋白。发现 7 个亲缘关系组中部分物种 PAL 蛋白呈家族性聚集，不同纲目物种之间的 PAL 蛋白也具有较高的同源性。



黑色为谷子，青色为二穗短柄草，黄色为高粱，蓝色为狗尾草，紫色为拟南芥，红色为水稻。

Black is *Setaria italica*, cyan is *Brachypodium distachyon*, yellow is *Sorghum bicolor*, blue is *Setaria viridis*, purple is *Arabidopsis thaliana*, red is *Oryza sativa.*

图 3 不同物种 PAL 蛋白进化树

Fig.3 Phylogenetic tree of PAL protein in different orders

2.4 谷子 PAL 蛋白的结构域分析

通过 ProSite 软件对谷子 PAL 蛋白的结构域分析，结果发现所有 PAL 蛋白均具有保守的 PAL 结构域。SiPAL7 蛋白除含有 PAL 结构域以外还具有 HtRna 结构域、HGTP 结构域，其中 HtRNA 结构域可能调控氨酰腺苷酸的合成，HGTP 结构域可能与相关蛋白质的合成有关（图 4）。本研究还发现 SiPAL7 的氨基酸长度最长，拥有蛋白结构域最多，可能与其具有最多的外显子（6 个）有关，意味着拥有更多的遗传信息。另外，SiPAL11 虽同样具有较长的氨基酸序列，但只含有 PAL 蛋白结构域，暗示 SiPAL11 可能拥有一些低复杂度的蛋白结构域。通过 MEME 软件对谷子 PAL 蛋白结构域分析，发现 PAL 结合结构域的氨基酸组成较为稳定。

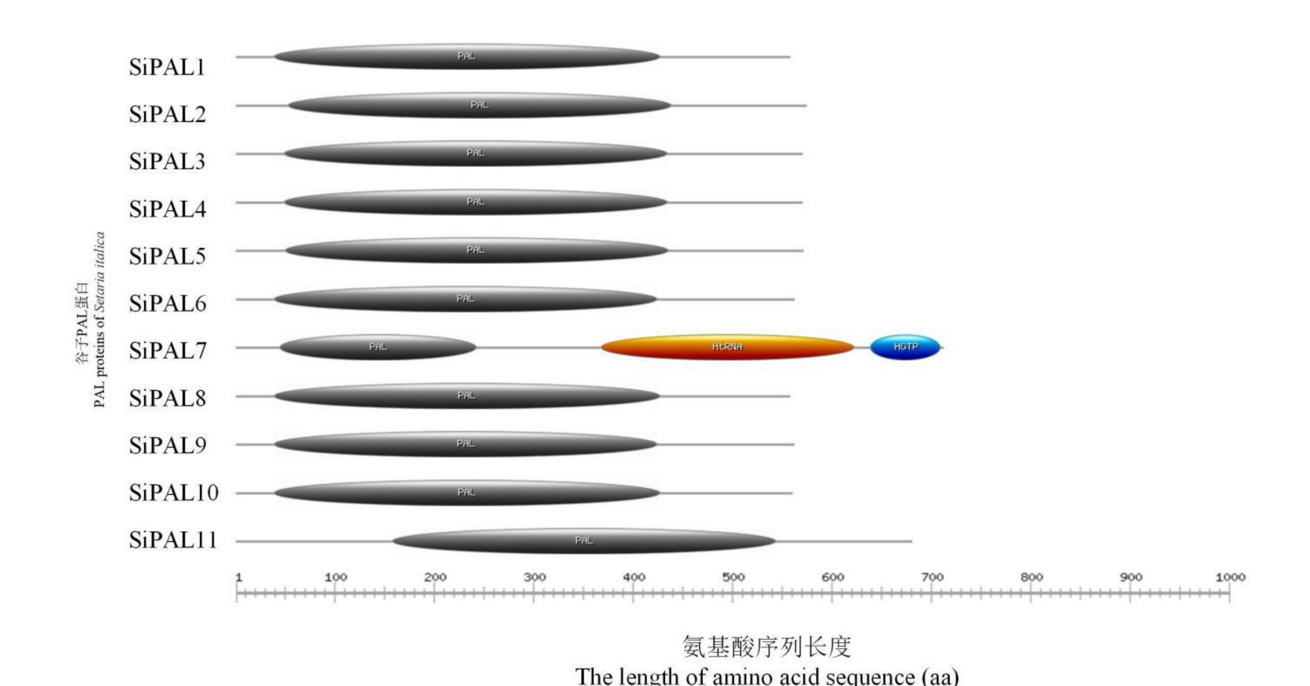


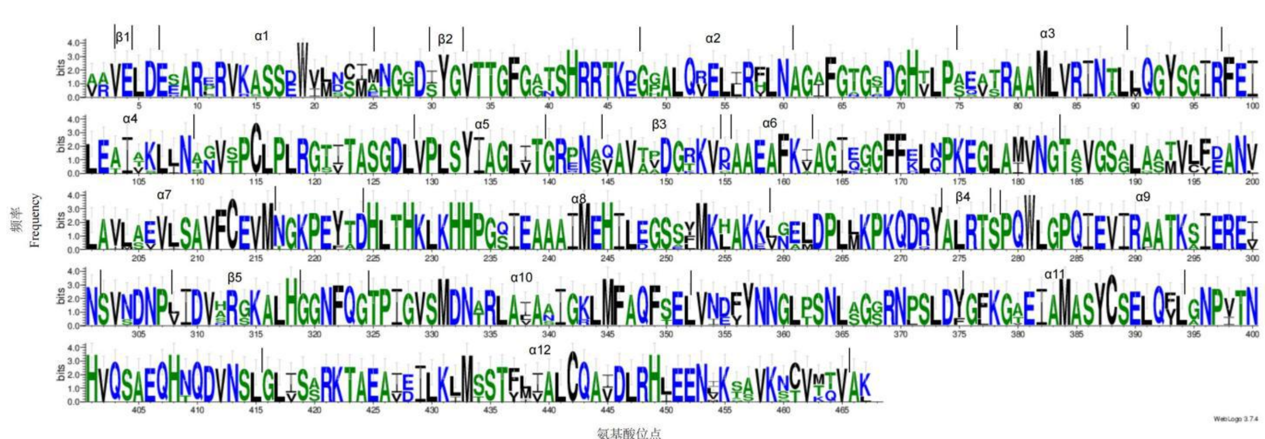
图 4 谷子 PAL 蛋白结构域示意图

Fig.4 Schematic diagram of the PAL protein domain of millet

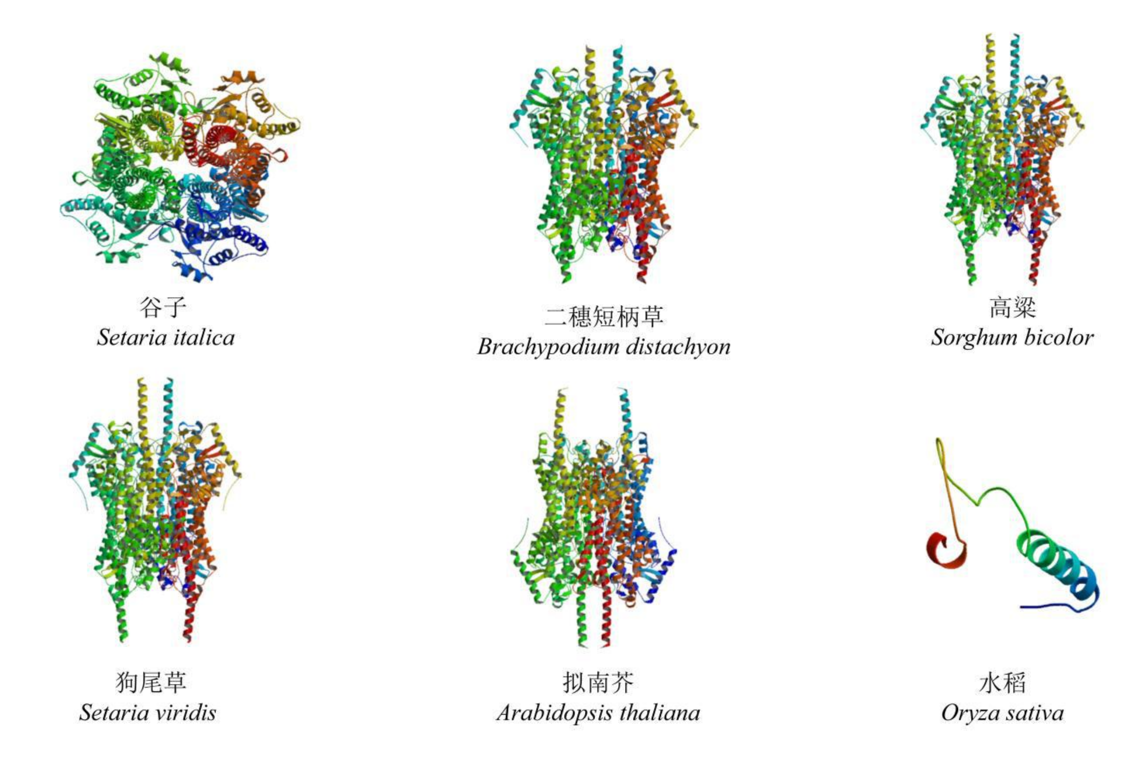
2.5 谷子 PAL 蛋白 3D 结构与序列分析

利用 SWISS-MODEL 软件分析各基因位点出现频率最高的保守基序，预测谷子 PAL 蛋白的 3D 结构，发现谷子 PAL 蛋白的 PAL 3D 结构在对称的基础上具有较多的螺旋、折叠方式（图 5：A）。通过 Superpose Version 1.0 将各物种间的 PAL 蛋白 3D 结构进行对比，比值越小证明物种间 PAL 蛋白结构越相似。由表 2 可知，狗尾草与谷子 3D 结构相差最小（0.38），与进化树分支聚类情况相一致，证明两者具有最近的亲缘关系，相差最大的是谷子与二穗短柄草（3.93），这与谷子和二穗短柄草为不同纲目的物种相对应。通过蛋白 3D 结构发现 PAL 蛋白的三级结构大多具有对称性，说明其蛋白质的结构单元具有一定的相似性，从基因进化来看，这种对称性代表着 *PAL* 基因存在复制融合。

A



B



A. PAL 氨基酸序列；B. PAL 蛋白 3D 结构示意图。

A. PAL amino acid sequence；B. PAL protein 3D structure diagram.

图 5 PAL 蛋白的 3D 结构及序列

Fig.5 3D structure and sequence of PAL protein

表 2 PAL 蛋白叠加比对

Table 2 PAL protein stacking ratio

项目 Item	谷子 *Setaria italica*
二穗短柄草 *Brachypodium distachyon*	3.93
高粱 *Sorghum bicolor*	0.67
狗尾草 *Setaria viridis*	0.38
拟南芥 *Arabidopsis thaliana*	0.81
水稻 *Oryza sativa*	0.95

2.6 谷子、水稻 *PAL* 同源共线性分析

利用 Ensembl Plants 网站 synteny 功能得到谷子和水稻 *PAL* 同系物的同源共线图。通过染色体定位及基因位置，绘制谷子和水稻 *PAL* 同源物的同源共线图（图 6 仅展示代表成员）。结果表明，谷子 11 个 *PAL* 家族成员均可在水稻中找到共线基因。如含有 *Os02g0626100*、*Os02g0626400* 等的水稻 2 号染色体基因组区域与谷子 1 号染色体的基因组块具有共线性，含有 *Os05g0150900* 的水稻 5 号染色体基因组区域与谷子 3 号染色体的基因组块具有共线性；同样含有 *Os04g0518100*、*Os04g0518400* 的水稻 4 号染色体基因组区域与谷子 7 号染色体组块具有共线性。

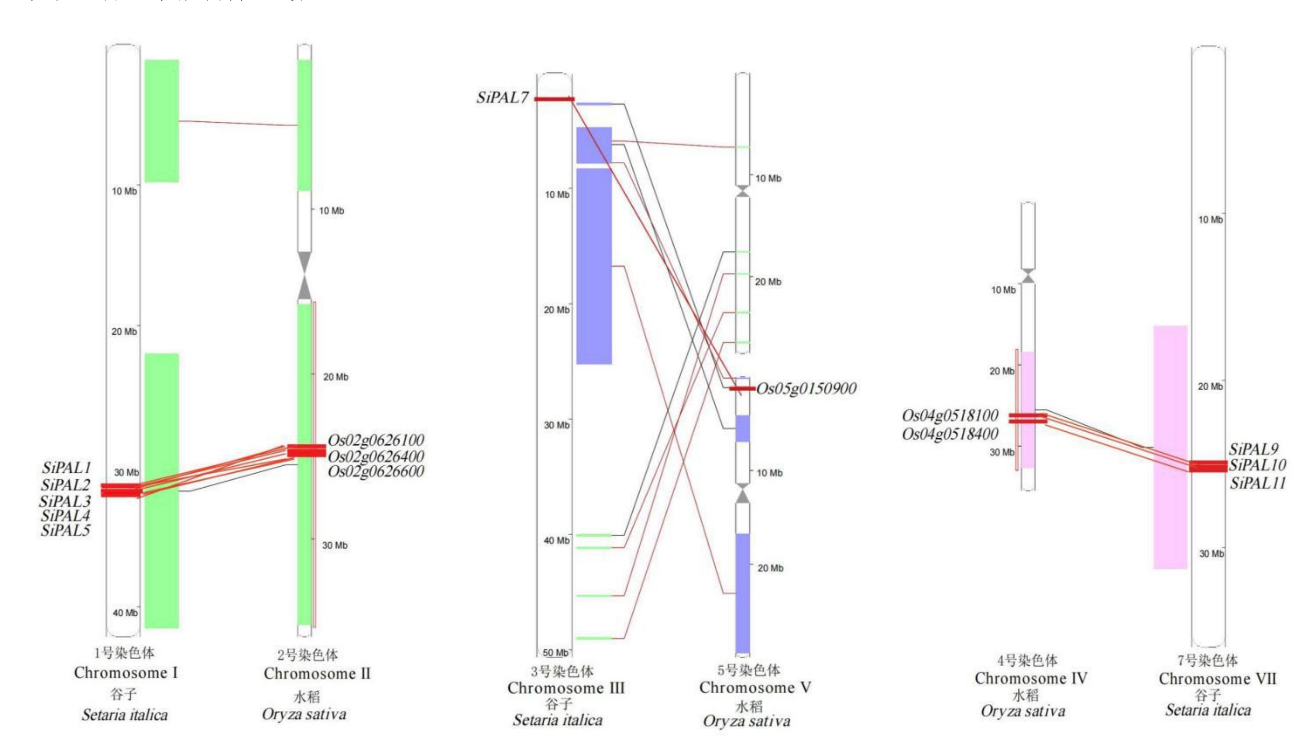


图 6 谷子和水稻 *PAL* 基因共线性分析

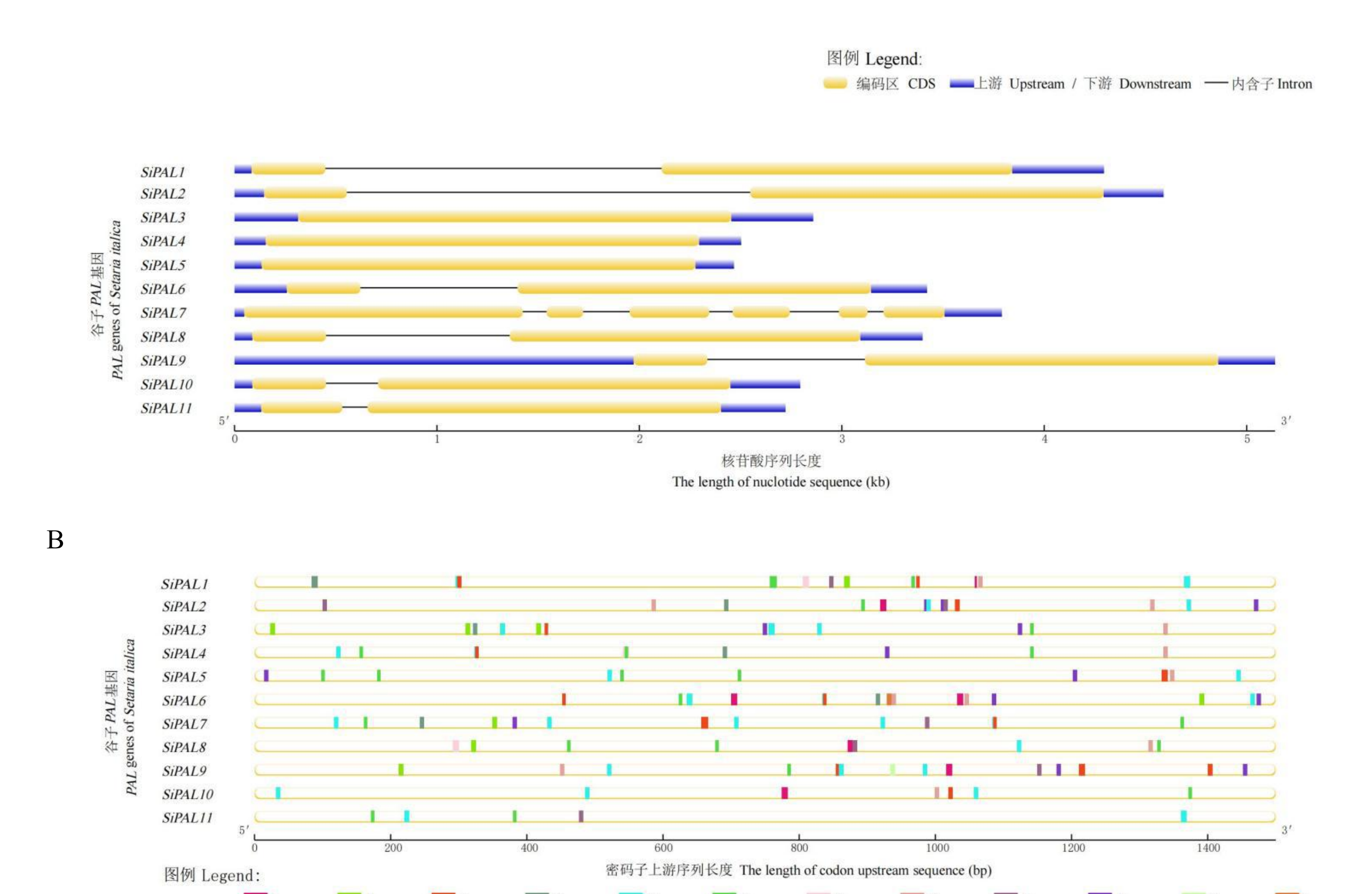
Fig.6 Collinearity analysis of *PAL* gene in millet and rice

2.7 *PAL* 基因结构分析

利用 GSDS2.0 对谷子 *PAL* 序列信息分析并可视化，得到 *PAL* 基因内含子-外显子结构模型图（图 7：A），发现 *SiPALs* 基因大多数只具有 1 个内含子（*SiPAL1*、*SiPAL2*、*SiPAL6*、*SiPAL8*、*SiPAL9*、*SiPAL10*、*SiPAL11*），且这些基因的外显子结构及大小具有一定的相似性，这种结构间的相似性说明他们可能在植物的生化过程中执行相同的作用。*SiPAL3*、*SiPAL4*、*SiPAL5* 同样具有相同的外显子结构，但均不含有内含子。*SiPAL7* 拥有最多的内含子数量（5）。

通过上述方法将 plantCARE 分析得到的顺式作用元件区域进行可视化，得到 *PAL* 顺式作用元件分布图（图 7：B）。结果发现 *PAL* 家族中含有多种激素信号响应元件和环境信号响应元件。其中分布最广的为茉莉酸响应元件，存在于所有 *PAL* 基因中，暗示 *PAL* 基因通过响应植物内源激素参与植物抗病过程；分布最少的元件为胚乳表达元件，只存在于 *SiPAL9* 中；其他不同类型顺式作用元件如胁迫元件、光响应等不均匀分布在 *SiPALs* 各个位置。通过上述结果可以看出，*PAL* 家族基因在谷子发育、抗病及胁迫过程中发挥重要作用。

A



A. 防御与应激响应；**B**. 赤霉素响应；**C**. 脱落酸响应；**D**. 生长素响应；**E**. 光响应；**F**. 茉莉酸响应；**G**. 玉米醇溶蛋白调控元件；**H**. 分生组织诱导；**I**. MYB 结合位点；**J**. 缺氧诱导；**K**. 胚乳表达；**L**. 低温胁迫。

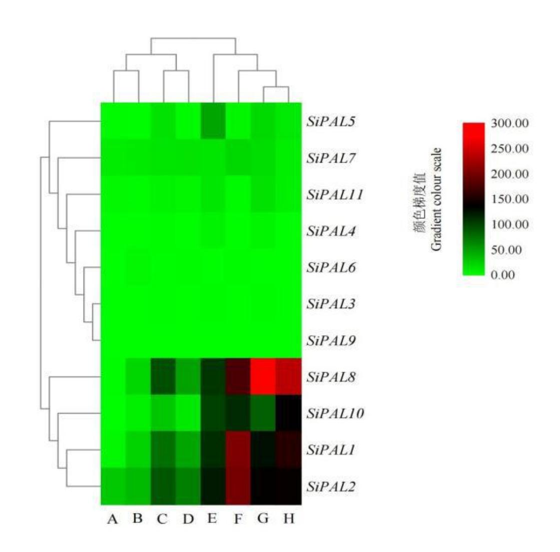
A. Defense and stress responsiveness; **B**. Gibberellin responsiveness; **C**. Abscisic acid responsiveness; **D**. Auxin responsiveness; **E**. Light responsiveness; **F**. MeJA responsiveness; **G**.Zein metabolism regulatory elements; **H**. Meristem induced expression; **I**. MYB binding site; **J**. Hypoxia induced expression; **K**. Endosperm expression; **L**. Low temperature stress.

图 7 *PAL* 基因内含子-外显子结构及顺式作用元件

Fig.7 *PAL* gene intron-exon structure and cis-acting

2.8 谷子 *PAL* 基因表达分析

从 Phytozome 数据库获得的 11 个基因在谷子不同组织中面对不同非生物胁迫的表达量数据，利用 TBtools 将结果可视化，绘制热图（图 8）。发现所有 *PAL* 基因均检测到表达量，其中 *SiPAL1*、*SiPAL2*、*SiPAL8*、*SiPAL10* 在强光诱导一周的芽、黑暗诱导的地上组织、红光诱导的地上组织、正常光诱导的根、干旱诱导的根、尿素诱导的根、强光诱导的穗中均具有明显高于其他基因的表达量。本研究发现在强光诱导生长 2 周叶片的表达量中只有 *SiPAL2* 具有微弱表达，其他基因几乎不表达。*SiPAL3*、*SiPAL6*、*SiPAL9* 在谷子不同组织中的表达量均明显低于其他基因。本研究结果发现，*PAL* 家族基因为诱导型表达，即在干旱或强光等诱导条件下，表达量为增强或抑制，但存在着不同基因的差异性。



A. 强光诱导叶片两周; **B**. 强光诱导芽一周; **C**. 黑暗诱导的地上组织; **D**. 红光诱导的地上组织; **E**. 尿素诱导的根; **F**. 强光诱导的穗; **G**. 正常光诱导的根; **H**.干旱诱导的根。

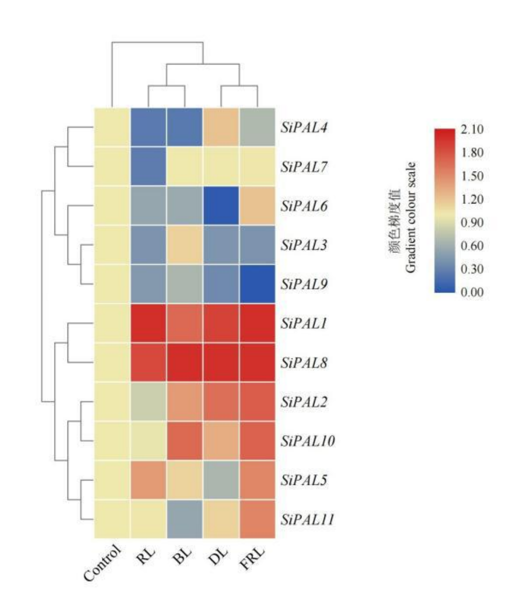
A. Strong light induced the leaves for two weeks; **B**. Induce bud with strong light for one week; **C**. Dark-induced ground tissue; **D**. Red light induced above-ground tissue; **E**. Urea induced roots; **F**. An ear induced by strong light; **G**. Normal light-induced roots; **H**. Drought-induced roots.

图 8.谷子 *PAL* 基因在不同诱导下各组织的表达量

Fig 8. The expression levels of millet *PAL* gene in various tissues under different induction

2.9 谷子 *PAL* 基因在不同光质照射下的 RT-qPCR 分析

为进一步探究 *PAL* 家族基因在谷子光调节反应中的作用，对谷子进行不同光质处理。由图 9 可知，红光照射下，*SiPAL1*、*SiPAL8*、*SiPAL5* 上调表达，其余基因与对照组相比，表现出不同程度的下降。蓝光照射下 *SiPAL1*、*SiPAL8*、*SiPAL10* 等上调表达，*SiPAL7* 与对照组相比无明显变化。黑暗处理下，*SiPAL1*、*SiPAL8*、*SiPAL2* 等上调表达，其他基因表现为下调，其中 *SiPAL6* 表达量极低。远红光照射下，*SiPAL1*、*SiPAL8*、*SiPAL2*、*SiPAL10*、*SiPAL5*、*SiPAL11* 等上调表达。*PAL* 家族基因在不同光质照射下表达量变化明显，说明 *PAL* 基因在谷子光形态建成中发挥重要作用，*SiPAL1*、*SiPAL8* 为主要成员。



Control. 正常光诱导；**RL**.红光诱导；**BL**. 蓝光诱导；**DL**. 黑暗诱导；**FRL**. 红远光诱导。

Control. Normal light inducation；**RL**. Red light induction; **BL**. Blue light induced; **DL**. Dark induction; **FEL**. Far red light induction.

图 9.谷子 *PAL* 基因在不同光质下的表达量

Figure 9. The expression of *PAL* gene in millet under different light quality

3 讨论与结论

PAL 是与植物抗性相关的关键酶（孙宇蛟等，2018），对其研究也备受关注，前人已经对多物种的 *PAL* 基因家族进行了分析，如玉米（邓路长等，2019）、苹果（张丽之等，2018）和陆地棉（*Gossypium hirsutum* Linn.）（杨郁文等，2017）。其中玉米和陆地棉均含有 13 个 *PAL* 基因，苹果含有 8 个 *PAL* 家族成员，与本研究中谷子鉴定出 11 个 *PAL* 基因结果相差不大，说明 *PAL* 基因以小基因家族形式存在，在物种分化过程中没有出现大幅度扩增现象。谷子 *PAL* 基因编码的蛋白中有部分蛋白具有相近的分子量、等电点等，与香蕉（杨会晓等，2019）和青天葵（*Nervilia fordii* ）（黄琼林等，2016）的研究较一致，说明其编码的蛋白具有相似的功能。

基因复制事件是基因家族扩张的主要动力。本研究发现，谷子 *PAL* 基因呈簇状分布，在苹果（张丽之等，2018）、大豆（侯鹏等，2016）、西瓜（*Citrullus lanatus*）（Dong & Shang, 2013）中 *PAL* 染色体定位同样存在着簇状分布现象，其中西瓜 12 个 *PAL* 基因中有 7 个串联排列在 4 号染色体，2 个串联排列在 7 号染色体上，其余单独排列在染色体 2 号、3 号、8 号上，与谷子 *PAL* 染色体分布有着高度的相似性，说明在 *PAL* 基因家族的扩增中存在串联复制、分散复制、片段复制（郭栋等，2019）。共线性分析发现，11 个谷子 *PAL* 基因家族成员在水稻染色体组中均存在共线性关系，说明 *PAL* 基因在进化过程中保守性较高。

根据进化树的拓扑结构，谷子 PAL 蛋白进化树分为 3 组，SiPAL7 独自进化为一支，说明 SiPAL7 与其他成员同源性较低，可能具有不同起源或进化轨迹，本研究结果与陆地棉（杨郁文等，2017）具有一致性。系谱树内同一进化枝 *PAL* 成员基因结构较为一致，具有较高的保守性。但III组成员 *SiPAL7* 与其他家族成员相比基因结构差异较大，拥有更多的内含子数量，这暗示 *PAL* 基因家族具有多样化的转录调控过程。*PAL* 基因家族成员结构的差异性可能会影响其功能活性。

启动子分析发现 *PAL* 家族基因不仅含有大量非生物胁迫元件，还存在光响应、激素响应等多种类型元件，不同 *PAL* 家族成员所含元件数量和种类不同，说明 *PAL* 基因家族广泛参与不同生物学调控过程，不同 *PAL* 基因具有其特异调控模式。

植物在遭受干旱、高温等胁迫时，会迅速产生大量活性氧（ROS）造成细胞结构损伤。苯丙烷代谢途径中产生的类黄酮等次生代谢产物，具有清除 ROS 的抗氧化活性（杨会晓等，2019）。本研究发现，*PAL* 家族基因多为诱导型表达，在受到不同胁迫刺激时，*SiPALs* 表达量迅速提升，说明 *PAL* 家族基因广泛响应不同非生物胁迫，类黄酮等次级代谢产物在非生物胁迫过程中可能具有较高的合成活性。同时发现，部分基因具有相似的响应模式，说明 *SiPALs* 可能存在功能冗余。光质在植株建成、生长发育过程中具有重要作用。荧光定量分析结果表明，在不同光照条件下，*PAL* 家族基因差异表达。*SiPAL5* 在红光、红远光高表达、*SiPAL11* 在红远光高表达等，这些变化说明 *PAL* 家族基因在谷子光调节途径中存在复杂的调控机制，不同 *PAL* 基因存在功能分化。

参考文献

BAILEY TL, BODEN M, BUSKE FA, et al., 2009. MEME SUITE:tools for motif discovery and searching[J]. Nucl Acid Res, 37(2): 202-208.

BENNETZEN JL, SCHMUTZ J, WANG H, et al., 2012. Reference genome sequence of the model plant setaria[J]. Nat Biotechnol, 30(6): 555-561.

CHEN CJ, CHEN H, ZHANG Y, et al., 2020. TBtools: An integrative toolkit developed for interactive analyses of Big Biological Data[J]. Mol Plant, 13(8): 1194-1202.

ChEN M, ZHANG X, ZHANG Y, et al., 2018. Cloning and expression analysis of phenylalanine ammonia lyase gene (PAL) in grapevine[J]. Acta Agric Boreal-Sin, 33(6): 64-71. [陈蒙，张雪，张宇，等，2018. 山葡萄苯丙氨酸解氨酶基因（PAL）的克隆与表达分析[J]. 华北农学报，33（6）：64-71.]

DONG CJ, SHANG QM., 2013. Genome-wide characterization of phenylalanine ammonia-lyase gene family in watermelon (*Citrullus lanatus*) [J]. Planta, 238 (1): 35-49.

DENG LC, CUI LN, YANG L, et al., 2019. Identification of maize phenylalanine ammonia lyase family genes and disease resistance analysis of sheath blight[J]. Mol Plant Breed, 17(3): 891-897. [邓路长，崔丽娜，杨麟，等，2019. 玉米苯丙氨酸解氨酶家族基因的鉴定与纹枯病的抗病分析[J]. 分子植物育种，17（3）：891-987.]

FINN RD, BATEMAN A, CLEMENTS J, et al., 2008. The Pfam protein families database[J]. Nucl Acid Res, 36(1): 281-288.

FRASER CM, CHAPPLE C, 2011. The phenylpropanoid pathway in *Arabidopsis*[J]. Arabidopsis Book, 9: e0152.

GAI JT, SHEN JK, WANG P., 2016. Identification and sequence analysis of PAL gene families in major crops[J]. Jiangsu Agric Sci, 44(6): 45-49. [盖江涛，沈建凯，王鹏，2016. 主要作物中 PAL 基因家族的鉴定和序列分析[J]. 江苏农业科学，44（6）：45-49.]

GUO D, DU M, ZHOU BY, et al., 2019. Identification and bioinformatics analysis of maize *SAUR* gene family[J]. Plant Genetic Resour, 20(1): 90-99. [郭栋，杜媚，周宝元，等，2019. 玉米 *SAUR* 基因家族的鉴定与生物信息学分析[J]. 植物遗传资源学报，20（1）： 90-99.]

HOLUB EB, 2001. The arms race is an ancient history in Arabidopsis, the wildflower[J]. Nat Rev Genet, 2(7): 516-527.

HOU P, LIANG D, ZHANG WG, et al.， 2016. Study on the temporal and spatial expression of phenylalanine ammonia lyase gene family in soybean[J]. Crops, 32(2) : 57-62. [侯鹏，梁冬，张卫国，等，2016. 苯丙氨酸解氨酶基因家族在大豆中的时空表达研究[J]. 作物杂志，32（2）：57-62.]

HUANG QL, HE R, ZHAN RT, 2016. The sequence characteristics and expression analysis of *PAL* gene of *Cyclobalanopsis sinensis*[J]. J Henan Agric Sci, 45(2): 104-108. [黄琼林，何瑞，詹若挺，2016. 青天葵 *PAL* 基因序列特征和表达分析[J]. 河南农业科学，45（2）：104-108.]

HU B, JIN J, GUO AY, et al., 2015. GSDS 2.0: an upgraded gene feature visualization server[J]. Bioinformatics, 31(8): 1296-1297.

HUNTER S, APWEILER R, ATTWOOD TK, et al., 2009. InterPro: the integrative protein signature database[J]. Nucl Acid Res, 37(1): 211－215.

JOOS H, HAHL BK, 1992. Phenylalanine ammonia-lyase in potato(*Solanum tuberosum* L.): genomic complexity, structural comparison of 2 selected genes and modes of expression[J]. Eur J Biochem, 204 (2): 621-629.

KIEFER F, ARNOLD K, BORDOLI L, et al., 2009. The SWISS-MODEL repository and associated resources[J]. Nucl Acid Res, 37(1): 387-392.

KOUKOL J, CONN EE, 1961. Metabolism of aromatic compounds in higher plants. IV.Purification and properties of phenylala-nine deaminase of Horden vulgare[J]. J Biol Chem, 236(10): 2692-2698.

LARKIN MA, BLACKSHIELDS G, BROWN NP, et al., 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0[J]. Bioinformatics, 23(21): 2947-2948.

LESCOT M, D HAIS P, THIJS G, et al., 2002. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. Nucl Acid Res, 30(1): 325-327.

LISTER CE, LANCASTER JE, WALKER JRL, 1996. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) activity and its relationship to anthocyanin and flavonoid levels in New Zealand-grown apple cultivars[J]. J Amer Soc Hortic Sci, 121(2): 281-285.

MARCHLER BAUER A, ANDERSON JB,CHITSAZ F, et al., 2009. CDD:specific functional annota-tion with the conserved domain database[J]. Nucl Acid Res, 37(1): 205-210.

NADEEM F, AHMAD Z, Ul HASSAN M, et al., 2020. Adaptation of foxtail millet (*Setaria italica*) to Abiotic Stresses: a special perspective of responses to nitrogen and phosphate limitations. [J]. Front Plant Sci, 11:187-198.

OlSEN KM, LEA US, SLIMESTAD R, et al., 2008. Differential expression of four Arabidopsis PAL genes; PAL1 and PAL2 have functional specialization in abiotic environmental-triggered flavonoid synthesis[J]. J Plant Physiol, 165(14): 1491-1499.

REICHERT AI, HE XZ, DIXON RA, 2009. Phenylalanine ammonia-lyase (PAL) from tobacco (*Nicotiana tabacum*) : charac-terization of the four tobacco PAL genes and active heterotet-rameric enzymes[J]. Biochem J, 424 (2) : 233-242.

SONG J, CAO XN, WANG HG, et al., 2019. Identification and expression analysis of SiASRs family genes[J]. Crops, 34(6): 33-42. [宋健，曹晓宁，王海岗，等，2019. SiASRs 家族基因的鉴定及表达分析[J].作物杂志，34（6）：33-42.]

SONG J, CAO XN, WANG HG, et al.， 2020. Identification and expression analysis of SBP protein gene family in millet millet[J]. Acta Agric Nucl Sin, 34(7): 1409-1420. [宋健，曹晓宁，王海岗，等，2020. 谷子 SBP 蛋白基因家族的鉴定及表达分析[J]. 核农学报，34（7）：1409-1420.]

SIGRIST CJ, CERUTTI L, DE CASTRO E, et al., 2010. PROSITE, a protein domain database for functional characterization and annotation[J]. Nucl Acid Res, 38(1): 161-166.

SUN YJ, CHEN X, CUI HN, et al., 2018. Bioinformatics analysis of cucurbitaceae *PAL* gene family and melon *PAL*4 gene cloning[J]. Mole Plant Breed, 16(15): 4910-4920. [孙宇蛟，陈欣，崔浩楠，等，2018. 葫芦科 *PAL* 基因家族生物信息学分析及甜瓜 *PAL*4 基因克隆[J]. 分子植物育种，16（15）：4910-4920.]

WANG C, WANG YF, ZHANG YH, et al., 2020. Research progress in the application of pangenomics in plants[J]. J Hunan Appl Sci, 7(2): 51-58. [王灿，王艳芳，张应华，等，2020. 泛基因组学在植物中的应用研究进展[J]. 湖南生态科学学报，7（2）：51-58.]

YANG HX, SUN YY, JIA CH, et al., 2019. Genome identification and expression analysis of banana phenylalanine ammonia lyase gene family[J]. Chin J Trop Crops, 40(10): 1949-1957. [杨会晓，孙媛媛，贾彩红，等，2019. 香蕉苯丙氨酸解氨酶基因家族的全基因组鉴定及表达分析[J]. 热带作物学报，40（10）：1949-1957.]

YANG YW, LI S, HUANG JY, et al., 2017. Identification and analysis of phenylalanine ammonia lyase family genes in upland cotton[J]. Mol Plant Breed, 15(4): 1184-1191. [杨郁文，李双，黄俊宇，等，2017. 陆地棉苯丙氨酸解氨酶家族基因的鉴定及分析[J]. 分子植物育种，15（4）：1184-1191.]

WANG Y, DENG D, SHI Y, et al., 2012. Diversification, phylogeny and evolution of auxin response factor (ARF) family: insights gained from analyzing maize ARF genes[J]. Mol Biol Rep, 39(3): 2401-2415.

ZHANG GY, LIU X, QUAN ZW, et al., 2012. Genome sequence of foxtail millet (*Setaria italica*) provides insights into grass evolution and biofuel potential[J]. Nat Biotechnol, 30(6): 549-554.

ZHANG LZ, FAN S, AN N, et al., 2018. Identification and expression analysis of *PAL* gene family members in the whole apple genome[J]. Acta Agric Zhejiang, 30(12): 2031-2043. [张丽之，樊胜，安娜，等，2018. 苹果全基因组 *PAL* 基因家族成员的鉴定及表达分析[J]. 浙江农业学报，30（12）：2031-2043.]